



SPW

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Akira Suyama, et al. **Examiner:** Frank Wei Min Lu
Serial No: 10/712,715 **Art Unit:** 1634
Filed: November 13, 2003 **Docket:** 14683Z
For: METHOD OF DETECTING NUCLEIC ACID **Dated:** January 12, 2007

Confirmation No.: 2123

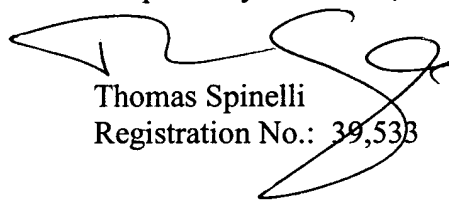
Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

CLAIM OF PRIORITY

Sir:

Applicants in the above-identified application hereby claim the right of priority in connection with Title 35 U.S.C. § 119 and in support thereof herewith submits a certified copy of Japanese Patent Application No. JP1999-283148, filed October 4, 1999 and Japanese Patent Application No. JP1999-283437, filed October 4, 1999.

Respectfully submitted,

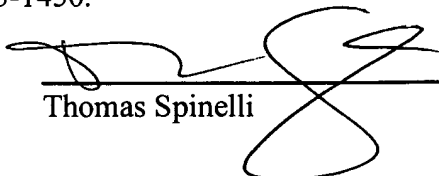

Thomas Spinelli
Registration No.: 39,533

Scully, Scott, Murphy & Presser, P.C.
400 Garden City Plaza, Suite 300
Garden City, New York 11530
(516) 742-4343
TS:dg

CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. §1.8(a)

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to: Mail Stop Amendment, Commissioner of Patents, Alexandria, VA 22313-1450.

Dated: January 12, 2007


Thomas Spinelli

0050680PIC

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

1/2 VS

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年10月 4日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第283148号

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

JP1999-283148

願人
Applicant(s):

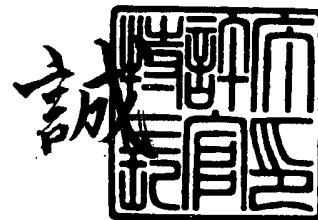
陶山 明
オリンパス株式会社

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2006年11月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

中嶋



出証番号 出証特2006-3089595

【書類名】 特許願

【整理番号】 A009807830

【提出日】 平成11年10月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明の名称】 核酸検出法

【請求項の数】 9

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都八王子市下柚木 3 - 2 - 6 - 5 0 1

 【氏名】 陶山 明

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリnpas光学工業株式会社内

 【氏名】 堀 邦夫

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都八王子市下柚木 3 - 2 - 6 - 5 0 1

 【氏名又は名称】 陶山 明

【特許出願人】

 【識別番号】 000000376

 【氏名又は名称】 オリnpas光学工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100058479

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴江 武彦

 【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

 【識別番号】 100084618

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

【識別番号】 100068814

【弁理士】

【氏名又は名称】 坪井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【選任した代理人】

【識別番号】 100097559

【弁理士】

【氏名又は名称】 水野 浩司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9602409

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書
【発明の名称】 核酸検出法
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 所定の配列を有する試料中の標的核酸 $N_1 \sim N_n$ (n は 2 以上の整数) を検出又は定量する方法であって、

a) 前記標的核酸 $N_1 \sim N_n$ 中の第一の部分配列 $F_1 \sim F_n$ に相補的な配列 $F_1' \sim F_n'$ と、各 $F_1' \sim F_n'$ に連結された標識物質を備えたプローブ $A_1 \sim A_n$ を含む第一のプローブ群と、

前記標的核酸 $N_1 \sim N_n$ 中の第二の部分配列 $S_1 \sim S_n$ に相補的な配列 $S_1' \sim S_n'$ と、各 $S_1' \sim S_n'$ に連結されたフラッグ配列 $FL_1 \sim FL_n$ とを備えたプローブ $B_1 \sim B_n$ を含む第二のプローブ群と
を準備する工程と、

b) 前記第一のプローブ群と、前記第二のプローブ群と、前記試料とを混合して、

前記標的核酸 $N_1 \sim N_n$ 中の前記第一の部分配列 $F_1 \sim F_n$ に前記プローブ $A_1 \sim A_n$ をハイブリダイズさせるとともに、前記第二の部分配列 $S_1 \sim S_n$ に前記プローブ $B_1 \sim B_n$ をハイブリダイズさせる工程と、

c) 前記標的核酸 $N_1 \sim N_n$ にハイブリダイズした前記プローブ $A_1 \sim A_n$ と前記プローブ $B_1 \sim B_n$ をライゲートして、プローブ $(A_1+B_1) \sim (A_n+B_n)$ を作出する工程と、

d) 前記フラッグ配列 $FL_1 \sim FL_n$ を該配列と相補的な配列 $FL_1' \sim FL_n'$ にハイブリダイズさせることにより、前記プローブ $(A_1+B_1) \sim (A_n+B_n)$ を回収する工程と、

e) 回収した前記プローブ $(A_1+B_1) \sim (A_n+B_n)$ 中の前記標識物質を検出又は定量することにより、前記試料中の標的核酸 $N_1 \sim N_n$ を検出又は定量する工程と、
を具備する方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法の工程c)の後に、さらに、プローブ $(A_1+B_1) \sim (A_n+B_n)$ と前記標的核酸分子からなるハイブリッドを変性させる工程を具備することを特徴とする方法。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の方法であって、
前記プローブ $A_1 \sim A_n$ のうち少なくとも一つがタグ配列を備えていることと、

ステップd)の後に、タグ配列を該配列と相補的な配列にハイブリダイズさせることにより、前記プローブ(A1+B1)～(An+Bn)を回収する工程を具備していることを特徴とする方法。

【請求項4】 請求項1～3の何れか1項に記載の方法であって、前記フラグ配列の相補的配列が固相担体に固相化された核酸分離装置を用いて、前記プローブ(A1+Bn)～(An+Bn)の回収を行うことを特徴とする方法。

【請求項5】 請求項1～4の何れか1項に記載の方法であって、前記固相担体が基板、粒子、管、繊維からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項6】 請求項1～5の何れか1項に記載の方法であって、前記第一の部分配列F1～Fnと、各F1～Fnに対応する前記第二の部分配列S1～Snが隣接していることを特徴とする方法。

【請求項7】 請求項1～6の何れか1項に記載の方法であって、前記プローブA1～Anと、A1～Anに対応する前記プローブB1～Bnのライゲートが、リガーゼによって行われることを特徴とする方法。

【請求項8】 請求項7に記載の方法であって、リガーゼによるライゲートの前に、PCRによって前記プローブA1～Anと前記プローブB1～Bnを伸長せしめる操作を行うことを特徴とする方法。

【請求項9】 請求項1～8の何れか1項に記載の方法であって、前記標的物質が蛍光物質、発光物質、色素、及び放射性同位元素からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中に存在する複数の標的核酸分子を検出又は定量する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

生体試料中に存在する特定の核酸分子を検出する技術は、特定臓器で発現・機能するタンパク質の核酸分子レベルでの解析、神経、脳あるいは免疫系での情報

遺伝子におけるタンパク質の発現制御の研究等において重要であるのみならず、遺伝的疾患の変異遺伝子の検出、癌の診断、ウイルス関連遺伝子の検出等遺伝子診断においても極めて重要である。

【0003】

しかしながら、従来の技術は、煩雑で且つ多くの工程を含み、熟練を要するために、操作によってはかなりの時間が必要とされることが多い。

【0004】

また、遺伝子診断などは確定診断として用いられるため誤りが許されず、さらに迅速性も要求されるために、迅速性を保ちながら高い精度有していなければならないが、従来の技術は、かかる要請を十分に満足するものとはいえない。

【0005】

試料中に存在する特定の核酸分子を検出する代表的な技術としては、ハイブリダイゼーション法がある。核酸のハイブリダイゼーション分析は、多種類の核酸の中から非常に少数の標的核酸(DNAやRNA)をプローブで検出する技術であるが、ハイブリダイゼーション法では、高感度なレポーター(酵素、蛍光色素、ラジオアイソトープ等)を用いても、低コピー数(1~1000個)の標的核酸分子を検出するのは困難である。さらに、ハイブリダイゼーション法には、非特異反応という大きな問題点が存するため、類似した複数の核酸分子から特定の核酸分子のみを検出することが難しい。

【0006】

このように、核酸ハイブリダイゼーション法は感度及び特異性が十分ではため、高感度な検出を要する臨床的診断に適用することは困難である。

【0007】

これに対して、古典的なハイブリダイゼーション法とは全く異なるDNA検出法として、フォードール(Fodor)ら、サイエンス(Science)第251巻、767-773頁、1991年は、写真平板技術を用いてマトリックス上にオリゴヌクレオチドを合成する方法を開示している。また、ピルング(Pirrung)ら、米国特許第5,143,854号、1992年9月1日は、シリコン基板上のアレイ様式にてのポリペプチドの大規模写真平板固相合成法を教示している。さらに、ビーティエ(Beattie)、「199

2年サンジェゴ会議：遺伝子認識（The 1992 San Diego Conference：Genetic Recognition）」1992年11月では、超微細ロボット工学システムを用いて、特異的DNA配列を含む微小液滴をガラス基体上の個々の超微細加工試料ウェルに滴下させて基体上にDNA配列を合成する方法を開示している。各試料ウェルにおけるハイブリダイゼーションは、交流電場で各個別超微小ウェルを取り囲んだ、ミニチュア電極試験固定体を応答指令信号を送ることによって検出する。

【0 0 0 8】

このような方法によって固相上に多種類のDNAが合成されたDNAチップは、ハイブリダイゼーション法に比べて操作が非常に簡便であるため、診断の迅速性を極めて向上させ得る。

【0 0 0 9】

しかし、従来のDNAチップでは、単に、検出すべき標的核酸の塩基配列と相補的な配列を有するプローブが固相されているにすぎないので、各プローブの至適ハイブリダイゼーション条件が一定ではなく、偽陽性ハイブリダイゼーションが起こりやすいという欠点を有している。

【0 0 1 0】

このような偽陽性ハイブリダイゼーションを避けるためには、各プローブ毎に最適化されたハイブリダイゼーション条件を付与すればよいが、極めて密に固相化された各プローブ毎に最適な条件を与えることは不可能であるために、従来のDNAチップは、特異性が十全でないというハイブリダイゼーションに存する根本的な問題を解決するには至っていない。

【0 0 1 1】

加えて、従来のDNAチップでは、検出すべき標的核酸の種類が変われば、新たにそれらの相補配列を固相化し直さなければならないので、極めて多種類の核酸が検出対象とされる臨床検査に適用するには汎用性が十分ではないという欠点をも有している。

【0 0 1 2】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、かかる事情に鑑みてなされたものであり、従来の核酸検出技術に比

べて、操作が簡便であるとともに向上した特異性を有し、且つ多種類の核酸に適用し得るという汎用性をも備えた核酸検出法を提供することを特徴とする。

【0 0 1 3】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明は、

所定の配列を有する試料中の標的核酸 $N1 \sim Nn$ (n は 2 以上の整数) を検出又は定量する方法であって、

a) 前記標的核酸 $N1 \sim Nn$ 中の第一の部分配列 $F1 \sim Fn$ に相補的な配列 $F1' \sim Fn'$ と、各 $F1' \sim Fn'$ に連結された標識物質を備えたプローブ $A1 \sim An$ を含む第一のプローブ群と、

前記標的核酸 $N1 \sim Nn$ 中の第二の部分配列 $S1 \sim Sn$ に相補的な配列 $S1' \sim Sn'$ と、各 $S1' \sim Sn'$ に連結されたフラッグ配列 $FL1 \sim FLn$ とを備えたプローブ $B1 \sim Bn$ を含む第二のプローブ群と

を準備する工程と、

b) 前記第一のプローブ群と、前記第二のプローブ群と、前記試料とを混合して

前記標的核酸 $N1 \sim Nn$ 中の前記 $F1 \sim Fn$ に前記プローブ $A1 \sim An$ を、前記標的核酸 $N1 \sim Nn$ 中の前記 $S1 \sim Sn$ に前記プローブ $B1 \sim Bn$ を夫々ハイブリダイズさせる工程と、

c) 前記標的核酸 $N1 \sim Nn$ にハイブリダイズした前記プローブ $A1 \sim An$ と前記プローブ $B1 \sim Bn$ をライゲートして、プローブ $(A1+B1) \sim (An+Bn)$ を作出する工程と、

d) 前記フラッグ配列 $FL1 \sim FLn$ を該配列と相補的な配列 $FL1' \sim FLn'$ にハイブリダイズさせることにより、前記プローブ $(A1+B1) \sim (An+Bn)$ を回収する工程と、

e) 回収した前記プローブ $(A1+B1) \sim (An+Bn)$ 中の前記標識物質を検出又は定量することにより、前記試料中の標的核酸 $N1 \sim Nn$ を検出又は定量する工程と、

を具備する方法を提供する。

【0 0 1 4】

【発明の実施の形態】

以下、図 1 を参照しながら、本発明の方法の一態様を説明する。

【0 0 1 5】

本方法の第一工程では、

ー 標的核酸 1、標的核酸 2、…、標的核酸 n（以下標的核酸N1～Nnと略記するの存在を検出又は定量すべき試料と、

ー 前記標的核酸 1 の第一の部分配列F1に相補的な配列と該配列に結合された標識物質とを有するプローブA1と、

前記標的核酸2の第一の部分配列F2に相補的な配列と該配列に結合された標識物質とを有するプローブA2と…、

前記標的核酸 n の第一の部分配列Fnに相補的な配列と該配列に結合された標識物質とを有するプローブAnを含む（以下プローブA1～Anと略記する）第一のプローブ群と、

ー 前記標的核酸 1 の第一の部分配列F1とは異なる第二の部分配列S1に相補的な配列と該配列に結合されたフラッグ配列FL1とを有するプローブB1と、

前記標的核酸 2 の第一の部分配列F2とは異なる第二の部分配列F2に相補的な配列と該配列に結合されたフラッグ配列FL2とを有するプローブB2と…

前記標的核酸nの第一の部分配列Fnとは異なる第二の部分配列Snに相補的な配列と該配列に結合されたフラッグ配列FLnとを有するプローブBnを含む（以下プローブB1～Bnと略記する）第二のプローブ群とを混合する工程である。

【 0 0 1 6 】

前記検出又は定量すべき前記標的核酸N1～Nnは、任意の配列を有する任意の核酸であり得るが、遺伝病の原因遺伝子、癌関連遺伝子、又はウイルス由来の核酸など疾病のマーカーとなり得る核酸は、とりわけ好ましい標的核酸である。

【 0 0 1 7 】

それ故、前記試料には、血液、尿、唾液等の体液が含まれるが、体液以外の任意の試料を使用し得る。試料が固体であれば、酵素処理、界面活性剤又は有機溶媒の添加等の適切な方法で液体に溶解せしめればよい。

【 0 0 1 8 】

なお、本明細書で、「核酸」には、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、mRNA、全RNA

、hnRNA、合成RNAを含む全てのDNA及びRNAを意味するものとする。

【0 0 1 9】

各標的核酸N1～Nn中の第一の部分配列F1～Fnの塩基数は1塩基以上であり得るが、安定なハイブリダイゼーションを達成するために、20塩基以上であることが好ましい。各第一の部分配列は、標的核酸N1～Nnの塩基配列から任意に選択することができる。

【0 0 2 0】

各標的核酸N1～Nn中の第二の部分配列S1～Snの塩基数も1塩基以上であり得るが、第一の部分配列と同じく20塩基以上であることが好ましい。各第二の部分配列は、対応する第一の部分配列と異なる配列であれば、対応する第一の部分配列と部分的に重複してもよい。なお、この後の工程における操作を容易にするために各標的核酸N1～Nn中の第一の部分配列と第二の部分配列は、全て隣接するように選択することが好ましい。

【0 0 2 1】

プローブA1～Anは、標的核酸N1～Nnから任意に選択した第一の部分配列F1～Fnと相補的な配列F1'～Fn'を有しているので、標的核酸N1～NnとプローブA1～Anを混合すると、プローブA1～Anは対応する標的核酸N1～Nn中のF1'～Fn'とハイブリダイズすることができる。

【0 0 2 2】

ここで「相補的な配列」とは、適切な条件下において、所定の標的核酸のみに特異的にハイブリダイズし得る配列を意味する。

【0 0 2 3】

各プローブA1～Anには、標的核酸N1～Nnの検出又は定量を可能とするために、標的物質 1 1 が連結されている。好ましい標識物質は、FITC等の蛍光物質、発光物質、³²P等の放射性物質、高吸収性物質、高光反射性物質、高電位性物質、磁性物質、及び色素であるが、これらに限定されない。特に蛍光物質、放射性物質、及び色素は好ましい標的物質である。なお、プローブA1～Anには、各々異なる標的物質を結合することも可能である。

【0 0 2 4】

プローブB1～Bnは、標的核酸N1～Nnから任意に選択した第二の部分配列と相補的な配列を有しているので、標的核酸N1～NnとプローブB1～Bnを混合すると、プローブB1～Bnは対応する標的核酸N1～Nn中のS1'～Sn'とハイブリダイズすることができる。ここで、「相補的な配列」とは前述のとおりである。

【0025】

各プローブB1～Bnには、後の工程でプローブB1～Bn及びプローブB1～Bnが連結された配列を特異的に回収するために、夫々フラッグ配列FL1～FLnが連結されている。フラッグ配列の塩基数及び配列は任意のものであり得るが、同様の至適ハイブリダイゼーション条件を有する組み合わせとなるように選択することが好ましい。

【0026】

フラッグ配列FL1～FLnは、標的核酸N1～Nnの検出又は定量を容易にするために、少なくとも一部、好ましくは全てが異なるものであることが好ましい。しかし、前記プローブA1～Anに複数種の標識物質を結合せしめたときには、標識物質による特異的な検出又は定量が可能となるので、各フラッグ配列の一部又は全部を同じ配列にすることもできる。

【0027】

前述のように、各標的核酸N1～Nn中の第一の部分配列F1～Fnと第二の部分配列S1～Snは隣接するように選択するのが好ましいので、F1～FnとS1～Snをこのように選択すれば、プローブB1～BnとプローブA1～Anは、互いに隣接して、対応する標的核酸N1～Nnにハイブリダイズすることになる。従って、プローブB1～Bn中の各フラッグ配列は、図1に示されているように、プローブA1～An中の各標識物質と対向しない末端に連結することが好ましい。

【0028】

本方法の第二工程では、対応する各標的核酸N1～NnにプローブA1～AnとプローブB1～Bnをハイブリダイズさせ、プローブA1～AnとプローブB1～Bnをライゲートする工程である。

【0029】

各プローブを対応する標的核酸にハイブリダイズさせるには、標的核酸が一本

鎖ならば、別段の処理を行わずに、標的核酸を含む試料と両プローブ群を混合すればよい。標的核酸N1～Nnが二本鎖である場合には、例えば90℃程度の高温で数分間静置して、相補的結合を解離せしめた後に、両プローブ群を添加し、例えば50℃程度の温度で2～3時間静置することにより、ハイブリダイズを行えばよい。勿論、ハイブリダイゼーションの条件、すなわち使用する緩衝液の種類、温度条件、時間等は標的核酸の種類に応じて適宜選択し得ることは、当業者であれば自明であろう。

【0030】

ハイブリダイゼーションを行うと、プローブA1～AnとプローブB1～Bnは対応する標的核酸N1～Nnに結合するので、リガーゼ等を作用させれば、連結部12を介してプローブA1～AnとプローブB1～Bnを連結することにより、プローブA1+B1、プローブA2+B2、…プローブA1+Bn（以下プローブ(A1+B1)～(An+Bn)と略記する）を作出することが可能となる。

【0031】

両プローブ群の連結するために使用し得る好適なリガーゼには、サーマス・アクアティカス(Thermus aquaticus)のTaqDNAリガーゼが含まれるが、これに限定されず、標的核酸の種類に応じて任意のDNAリガーゼ又はRNAリガーゼを使用し得る。

【0032】

また、酵素的な手法に変えて、化学的な手法で両プローブ群を連結してもよい。

【0033】

プローブA1～AnとプローブB1～Bnが隣接していないときには、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼによって、好ましくはTaqポリメラーゼ等の耐熱性DNAポリメラーゼを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、両プローブ群の間隙に核酸塩基を導入した後に、酵素的な手法又は化学的な手法で両プローブ群を連結してもよい。

【0034】

第三の工程では、対応する標的核酸から各プローブ(A1+B1)～(An+Bn)を解離

させる。プローブの解離は、熱的変性及び化学的変性を含む変性処理によって達成される。熱的変性によりプローブを解離させる場合には、生理的条件下では、85℃以上、好ましくは90℃以上の温度にすればよいが、当業者であれば、プローブ中のGC含量に応じて、適切な温度を選択し得ることは自明であろう。

【0 0 3 5】

なお、標的核酸にハイブリダイズしたプローブの末端が、標的核酸の末端からさらに延出して一本鎖領域を形成していれば、変性処理工程は省略することは可能であるが、通常は変性処理工程を加えることが望ましいであろう。

【0 0 3 6】

第四の工程では、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)を特異的に回収し、標的核酸を検出又は定量する操作を行う。

【0 0 3 7】

プローブ(A1+B1)～(An+Bn)を特異的に回収するためには、フラッグ配列FL1～FLnと相補的な配列FL1'～FLn'を固相化せしめた固相担体を用いる方法が極めて好ましい。フラッグ配列と相補的な配列を固相化すべき固相担体には、シリコンやガラス等の基板、粒子、試験管やバイアル瓶等の容器、繊維、キャピラリー等の毛管を含む管、アフィニティーカラム、フィルター、電極等が含まれるが、これらに限定されない。好ましい固相担体は、シリコン基板、粒子、及びキャピラリーである。

【0 0 3 8】

前述のように、フラッグ配列FL1～FLnはプローブBの中に含まれる人為的な配列であるから、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)とのハイブリダイゼーションの特異性が向上するように、FL1～FLnを選択することができる。

【0 0 3 9】

より具体的には、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)のGC含量や核酸塩基の組成等を適切に選択すれば、各プローブの至適ハイブリダイゼーション条件（例えば温度、塩濃度等）を均一にそろえることができるため、誤対合が発生する確率が著しく減少又は喪失し、特異性が極めて向上することになる。

【0 0 4 0】

これに対して、標的核酸の相補的配列を固相化する従来の核酸検出方法では、固相化されている各プローブの至適ハイブリダイゼーション条件は全く異なるので、全てのプローブに適した条件を設定することは不可能であり、特異性が低下する。

【0041】

また、フラッグ配列は変化させずに、第一の部分配列と第二の部分配列のみを変化させれば、一種類の固相担体で所望の標的核酸を検出・定量することが可能となるので、本方法は汎用性が高い。

【0042】

以上の操作によって特異的に回収されたプローブ(A1+B1)～(An+Bn)には、標識物質が連結されているので、標識物質に応じた適切な方法によりプローブ(A1+B1)～(An+Bn)を検出又は定量できる。ライゲーションは、標的核酸とハイブリダイズしなければ起こらないので、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)を検出又は定量すれば、間接的に各標的核酸を検出又は定量し得ることになる。

【0043】

次に、図2を参照しながら、本発明の方法の別の実施態様を説明する。

【0044】

本方法の第一の工程では、図1に記載の方法の第一の工程と基本的に同じであり、標的核酸N1～Nnを検出又は定量すべき試料と、プローブA1～Anを含む第一のプローブ群と、プローブB1～Bnを含む第二のプローブ群とを混合する操作を行うが、プローブA1～Anがタグ配列Tg1～Tgnを具備している点のみが異なる。

【0045】

タグ配列は、塩基配列の他、ビオチン等の小分子、抗体等のタンパク質等、特定の物質と特異的に結合し得る任意の物質であり得る。

【0046】

ハイブリダイゼーション及びライゲーションを行う第二の工程、フラッグ配列によるプローブ(A1+B1)～(An+Bn)の回収を行う第三の工程は、図1に記載の方法の対応する工程と基本的に同じである。なお、図2では、変性処理過程は省略してあるが、変性処理過程を行ってもよく、通常は変性処理過程を行うことが好

ましい。

【 0 0 4 7 】

第四の工程は、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)とともに副次的に回収された遊離のプローブB1～Bnには存在しないTg1～Tgnの相補的配列Tg1'～Tgn'を利用して、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)のみを選択し、検出又は定量する工程である。

【 0 0 4 8 】

遊離のプローブB1～BnがFL1'～FLn'にハイブリダイズしているために、FL1～FLnにハイブリダイズしたプローブ(A1+B1)～(An+Bn)の絶対量が減少している第三の工程とは異なり、第四の工程では、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)のみがハイブリダイズしているので、固相化されたプローブ(図ではTg1'～Tgn')にハイブリダイズする標識物質の絶対量が増大し、高い感度で標的核酸を検出又は定量することが可能となる。

【 0 0 4 9 】

図2では、第三の工程の後に、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)をそのまま解離させているが、少なくともタグ配列を含むように、プローブ(A1+B1)～(An+Bn)を切断してもよいことは自明であろう。

【 0 0 5 0 】

【発明の効果】

以上のように、本発明は、特異性及び簡便性に優れ、且つ汎用性が向上した核酸の検出又は定量方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施態様を示す図。

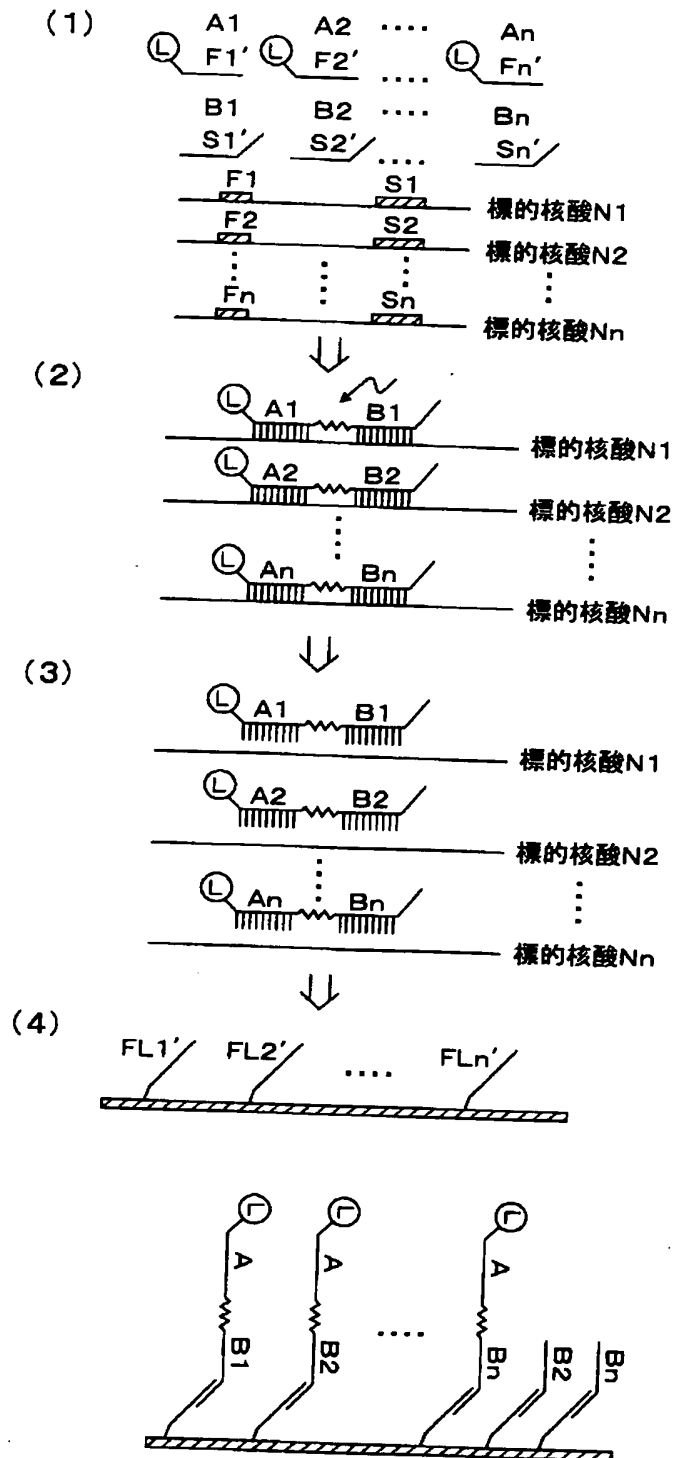
【図2】

本発明の別の実施態様を示す図。

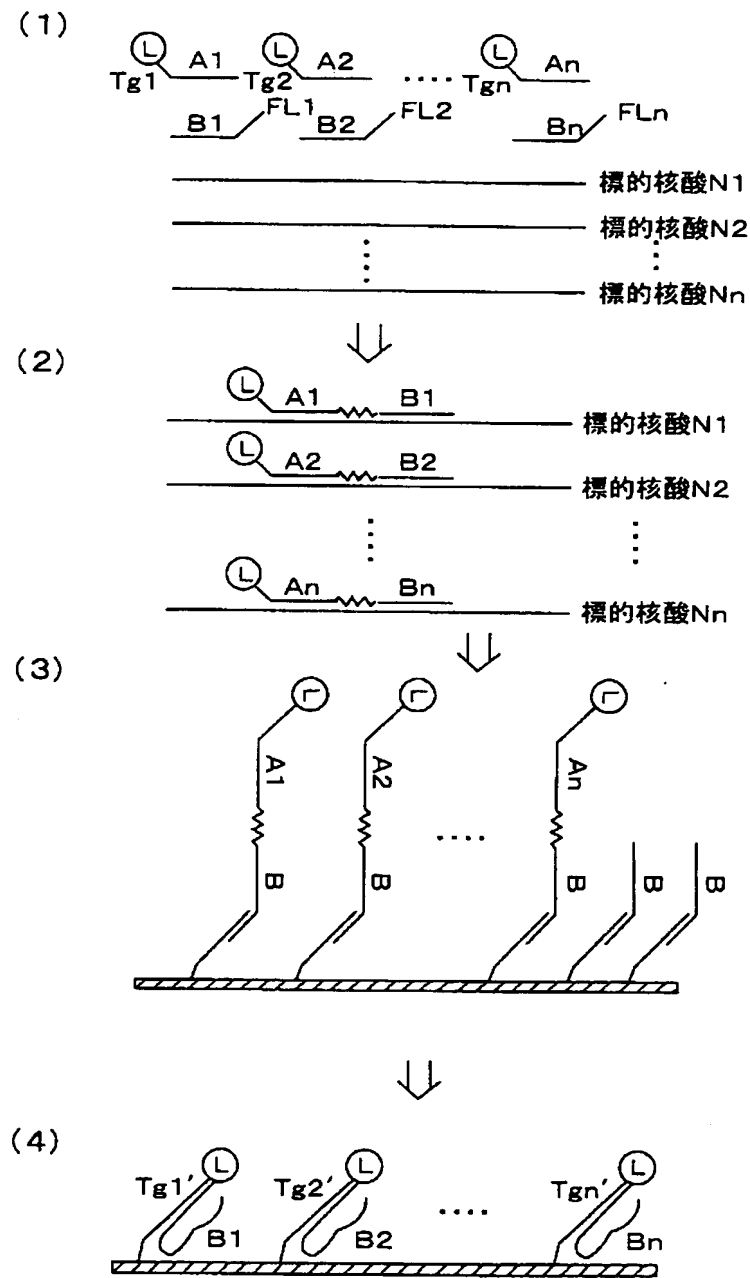
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来の核酸検出技術に比べて、操作が簡便であるとともに向上した特異性を有し、且つ多種類の核酸に適用し得る汎用性を備えた核酸検出法を提供する。

【解決手段】 上記課題を検出するために、ハイブリダイゼーションの特異性が向上するように人為的に選択したプローブ群が固相された担体を用いて、所定の配列を有する試料中の標的核酸を検出又は定量する方法を提供する。

【選択図】 図 1



特願平 1 1 - 2 8 3 1 4 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 3 7 6]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 0 日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
氏 名 オリンパス光学工業株式会社
2. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由] 名称変更
住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号
氏 名 オリンパス株式会社

特願平 1 1 - 2 8 3 1 4 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 9 1 4 0 0 5 7]

1. 変更新月日

1 9 9 9 年 1 0 月 4 日

[変更新理由]

新規登録

住 所

東京都八王子市下柚木 3 - 2 - 6 - 5 0 1

氏 名

陶山 明